

**AGENT FOR PREVENTING DENTAL CARIES**

**Publication number:** JP2002114709

**Publication date:** 2002-04-16

**Inventor:** FUKUSHIMA KAZUO

**Applicant:** UNIV NIHON

**Classification:**

- international: **A61K39/395; A61P1/02; A61P43/00; C07K16/40; C12P21/08; A61K39/395; A61P1/00; A61P43/00; C07K16/40; C12P21/08; (IPC1-7): C07K16/40; C12P21/08; A61K39/395; A61P1/02; A61P43/00; C12R1/91**

- european:

**Application number:** JP20000304889 20001004

**Priority number(s):** JP20000304889 20001004

**Report a data error here**

**Abstract of JP2002114709**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To inhibit the formation of biofilm and suppress dental caries by using a mouse monoclonal antibody bonding to GTF-B of Streptococcus mutans and inhibiting the WIG synthesizing activity of the enzyme. **SOLUTION:** The active component of the objective agent for preventing dental caries is a monoclonal antibody against a glucose transferase-B(GTF-B) produced by Streptococcus mutans and inhibiting the WIG synthesizing activity.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-114709

(P2002-114709A)

(43)公開日 平成14年4月16日(2002.4.16)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード(参考)
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 39/395	P 4 B 0 6 4
A 6 1 P 1/02		A 6 1 P 1/02	4 C 0 8 5
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1 4 H 0 4 5
// C 0 7 K 16/40	Z N A	C 0 7 K 16/40	Z N A
C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 28 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-304889(P2000-304889)

(22)出願日 平成12年10月4日(2000.10.4)

(71)出願人 899000057

学校法人 日本大学

東京都千代田区九段南四丁目8番24号

(72)発明者 福島 和雄

千葉県松戸市栄町西2-870-1 日本大

学松戸歯学部内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4C085 AA14 BA14 BB22 CC02 DD23

DD37 DD84 EE01 GG08

4H045 AA30 BA10 CA11 DA75 DA89

EA29 FA72 FA74

(54)【発明の名称】 虫歯予防剤

(57)【要約】

【課題】 ストレプトコッカス・ミュータンスのGTF-Bに結合しそのWIG合成活性を阻害するマウスモノクローナル抗体を用いて、バイオフィルム形成阻害および虫歯発生抑制を可能とする。

【解決手段】 ストレプトコッカス・ミュータンスが産生するGTF-BのWIG合成活性を阻害する作用を有する該酵素に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする虫歯予防剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ストレプトコッカス・ミュータンスが産生するグルコシルトランスフェラーゼBの非水溶性グルカン合成活性を阻害する作用を有する該酵素に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする虫歯予防剤。

【請求項2】 ストレプトコッカス・ミュータンスが産生するグルコシルトランスフェラーゼBの非水溶性グルカン合成活性を阻害し、本菌がショ糖存在下で平滑歯面に固着・集落化するのを抑制する作用を有する該酵素に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする虫歯予防剤。

【請求項3】 前記グルコシルトランスフェラーゼBが、以下の(a)又は(b)に示すアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項1又は請求項2記載の虫歯予防剤。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加され、かつグルコシルトランスフェラーゼB活性を有するアミノ酸配列

【請求項4】 前記モノクローナル抗体が、前記グルコシルトランスフェラーゼBの活性部位の1つである配列番号2記載のアミノ酸配列で表されるデキストラン結合領域を認識し結合するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3記載の虫歯予防剤。

【請求項5】 前記モノクローナル抗体が、前記グルコシルトランスフェラーゼBの他の活性基である配列番号3記載で表されるショ糖結合部位を含むペプチド断片を認識し結合するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3記載の虫歯予防剤。

【請求項6】 前記モノクローナル抗体が、マウスーマウスハイブリドーマMHP126 (FERM P-17566)により産生されるモノクローナル抗体、又はマウスーマウスハイブリドーマMHP136 (FERM P-17567)により産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1記載の虫歯予防剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 虫歯原因菌ストレプトコッカス・ミュータンスの主要な病原因子であるグルコシルトランスフェラーゼBの非水溶性グルカン合成活性を強く阻害するモノクローナル抗体を使用して虫歯誘発性のバイオフィーム(歯垢)形成の抑制を図る受動免疫による虫歯予防剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 ヒトが歯を失う2大原因は虫歯(dental caries)と歯周炎である。世界中で最も蔓延している疾患である虫歯は、人類が確実な予防法を持たないため現在でもほとんどのヒトに発症し、身体や生活に多大な

影響を及ぼし続けている。本疾患は、歯垢(dental plaque)という歯面上に形成される細菌膜(バイオフィーム)中のミュータンスレンサ球菌(mutans streptococci)により人体中で最も硬い組織である歯質が不可逆的に侵される特異な細菌感染症である。

【0003】 ミュータンスレンサ球菌は、1. マンニトール等の糖アルコールを発酵できる、2. ショ糖から付着性の非水溶性グルカン(water-insoluble glucan, 以下WIG)を合成できる、3. WIG合成を介して歯面上に固着・集落化し、そこに虫歯誘発性のバイオフィームを形成できる、4. 動物に虫歯を誘発できる、等の共通の性質をもつストレプトコッカス・クリセツス(*Streptococcus cricetus*)、ストレプトコッカス・ラッタス(*Streptococcus rattus*)、ストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)、ストレプトコッカス・ソブリヌス(*Streptococcus sobrinus*)、ストレプトコッカス・ダウネイ(*Streptococcus downei*)等の7菌種8血清型からなる一群の口腔連鎖球菌の総称である。

【0004】 これらの中でヒトの口腔に棲息し虫歯発症に深く関わるのは、ストレプトコッカス・ミュータンスとストレプトコッカス・ソブリヌスの2菌種であり、ヒト口腔からの検出頻度の高いストレプトコッカス・ミュータンスが虫歯の主要原因菌と考えられている。これら2菌種は、染色体DNAのGC含量、細胞壁多糖の構造、溶血性、糖の発酵性、菌体内多糖やフルクタン合成能等、細菌学的性状を全く異にする別種の細菌であり、共通の特性である付着性WIG合成とそれを介した歯面への固着・集落化も、全く異なる酵素系及びメカニズムにより行われる。

【0005】 ストレプトコッカス・ミュータンスは、染色体上にg t f B、g t f C及びg t f Dという3種のグルコシルトランスフェラーゼ(glucosyltransferase)遺伝子を持っており、それらの発現により各々グルコシルトランスフェラーゼB(以下GTF-B)、グルコシルトランスフェラーゼC(以下GTF-C)、グルコシルトランスフェラーゼD(以下GTF-D)と呼ばれるグルカン合成酵素を主として菌体表面層上に産生分泌する。g t f Bとg t f Cの遺伝子産物であるGTF-BとGTF-Cは共にショ糖からWIGとイソマルトオリゴ糖を合成する類似した構造のイソ酵素であるが、WIG合成能はGTF-Bが、オリゴ糖合成能はGTF-Cが勝る。g t f D遺伝子産物であるGTF-Dはショ糖から水溶性グルカン(water-soluble glucan: 以下WSG)を合成する酵素である。本菌種がGTF作用を介して歯面に固着・集落化し、そこに虫歯誘発性のバイオフィームを形成するメカニズムに関しては、最近、遺伝子サイドからのアプローチが進み、PAc等と呼ばれる高分子量の菌体表面タンパク抗原とg t f C遺伝子産物であるGTF-Cが重要因子としてクローズアップされている。ストレプトコッカス・ミュータンスによる虫

歯誘発性バイオフィルムの形成は、1. 唾液タンパクの選択的吸着により歯面上にペリクルと呼ばれる薄膜が形成される、2. ペリクル面に本菌がP A cタンパクを介して初期付着する、3. 付着菌体はG T F-CのW I G合成作用によりその場に強固に固着する、4. 固着菌体に他の菌体が主にG T F-C作用を介して固着・集落化し、本菌に富む細菌膜(虫歯誘発性バイオフィルム)が形成される、という過程で進行するとの見解が現在一般化しつつある。

【0006】一方、ストレプトコッカス・ソプリヌスは、染色体上にg t f I, g t f U, g t f T及びg t f Sという4種のG T F遺伝子を持っており、それらの発現によりグルコシルトランスフェラーゼI (以下G T F-I) という1種類のW I G合成酵素と、グルコシルトランスフェラーゼU、-T、-S (以下G T F-U、-T、-S) と呼ばれる3種のW S G合成酵素を菌体外に産生分泌する。本菌種における付着性W I G合成と菌体の固着・集落化は、ストレプトコッカス・ミュータンスの場合と異なって、G T F-I酵素と3種のW S G合成酵素(未特定)の共同作用によりなされることが示唆されている。

【0007】虫歯病因論研究の進展に伴って、原因菌サイドから虫歯予防を図ろうとの応用研究、例えば、選択的殺菌剤、G T F阻害剤、バイオフィルム形成抑制剤、シーラント剤等の開発研究や原因菌及び病原因子に対する特異抗体を用いた受動免疫や能動免疫による虫歯予防研究等がこれまでに数多く行われ、G T Fによるショ糖からのW I G合成や菌体固着作用を阻害したり、表層タンパク抗原の初期付着作用を阻止する手段により、虫歯予防が可能であることが動物実験等で立証されている。しかし、G T F阻害剤やシーラント剤など一部実用化されているものの、歯磨きに替わりうる効果的で実用的な予防手段は未だ開発されていない。これからの虫歯予防手段として最も有望視されているのは、安全性と有用性の点から、虫歯菌のG T Fや菌体表層タンパクの機能を阻害するモノクローナル抗体を使用した受動免疫法である。目的に合った機能阻害抗体をポリクローナルに作製することは比較的容易であり、実際、動物モデル実験で虫歯予防効果を示すストレプトコッカス・ミュータンスの菌体結合性G T F (主にG T F-BとG T F-Cからなる) に対する鶏卵抗体(I g Y) が得られている。しかしながら、この種の抗体をモノクローナルに作製することは極めて難しい。一旦、有用なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを樹立できれば、同質のものを大量かつ安定に供給でき、バイオテクノロジー技法を駆使した大量生産化も可能である。

【0008】実際に、英国の研究グループは、ストレプトコッカス・ミュータンスの歯面ペリクルへの初期付着を阻害するP A cに対するI g Gタイプのマウスモノクローナル抗体を作成し、その虫歯予防効果をサルを用い

た動物モデル実験で実証している。さらに彼らは、その抗体遺伝子を植物細胞に導入して大量調製したリコンビナント抗体をヒトの歯面に塗布する手段により、口腔から3ヶ月間以上もの間、ストレプトコッカス・ミュータンスを完全除菌することに成功したと最近報告している(Nature medicine, 4:601-606, 1998)。しかしながら、彼らが作製した抗P A cモノクローナル抗体は特異性に問題があり、主要な歯垢構成細菌であるストレプトコッカス・サングイスなどの表層タンパク抗原とも反応性を示すため、その大量使用は口腔常在菌叢を大きく変える危険性がある。従って、受動免疫に使用する予防用抗体としては、特異性の高い虫歯菌G T Fに対する抗体が最適と思われる。

【0009】虫歯ペプチドワクチンの開発研究を行っている米国の研究グループは、ストレプトコッカス・ミュータンスのG T F-BやG T F-Cのショ糖結合領域(活性基の1つ)と同一配列のペプチドを化学合成し、それをマウスに免疫してG T F活性阻害能をもつI g Mタイプのモノクローナル抗体の作製に成功している。しかし、彼らが作製した抗体は、活性部位のアミノ酸配列が僅かながら異なるストレプトコッカス・ミュータンスのG T F-DのW S G合成活性とストレプトコッカス・ソプリヌスG T F-IのW I G合成活性に対しては阻害作用を示すものの、同一アミノ配列をもつ本命のG T F-B及びG T F-CのW I G合成活性に対しては全く阻害作用を示さない(Infec. Immun. 62:5470-5476, 1994)。従って、その種の抗体にストレプトコッカス・ミュータンスの除菌効果を期待することはできない。ストレプトコッカス・ソプリヌスの除菌用に使用できる可能性はあるが、効果が認められたとしてもI g Mタイプの抗体であるため、大量調製は容易ではない。

【0010】先に、本発明者らの研究グループは、ストレプトコッカス・ミュータンスの3種のG T Fを分別定量する方法を確立する目的で、それぞれのG T Fと特異的に反応する数多くのマウスモノクローナル抗体を作製し、それら特異抗体の識別試薬としての有用性を明らかにした。さらに、G T F-Bと反応性を示す抗体のうちの幾つかは該酵素のW I G合成活性に対して強い阻害作用を示すことを見出した。(Infec. Immun. 61:323-328, 1993)。また、ストレプトコッカス・ソプリヌスの4種のG T Fを識別する特異モノクローナル抗体を同様の方法で作製し、G T F-Iと反応する1抗体が当該酵素のW I G合成活性を明らかに阻害することを見ている(FE MS Immunol. Microbiol. 27:9-15, 2000)。しかしながら、それらの活性阻害抗体が、虫歯誘発性のバイオフィルム形成を抑制できるか否か、虫歯菌を感染させた動物の虫歯発生を抑制できるか否か、ヒトにおいて虫歯予防効果を示すか否か、等については不明である。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明は、ス

トレプトコッカス・ミュータンスのGTF-Bに結合しそのWIG合成活性を阻害するマウスモノクローナル抗体を用いて、バイオフィーム形成阻害および虫歯発生抑制を可能とする受動免疫用の虫歯予防剤を提供することを目的とする。

#### 【0012】

【課題を解決するための手段】これまで、虫歯誘発性のバイオフィーム形成に最も重要な働きをするストレプトコッカス・ミュータンスの因子は、前述したように、本菌が産生するGTF-Cであると考えられてきた。この見解は、GTF-Cのみを発現する遺伝子組換え体或いは変異株が、無処理及び唾液処理したガラス等の平滑面にショ糖存在下で固着し集落化できるのに対し、GTF-B発現株は固着・集落化できない事実が根拠になっている。しかし、本発明者らは、既得の形質転換株と抗GTF-Bモノクローナル抗体を用いたバイオフィーム形成試験およびラット使用の虫歯誘発実験により、実際の口腔内における虫歯誘発性バイオフィーム形成過程においてはGTF-Bが最も重要な病原因子であることを明らかにし、本発明を完成するに至った。

【0013】即ち、本発明はストレプトコッカス・ミュータンスが産生するGTF-BのWIG合成活性を阻害する作用を有する該酵素に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする虫歯予防剤である。さらに、本発明はストレプトコッカス・ミュータンスが産生するGTF-BのWIG合成活性を阻害し、本菌がショ糖存在下で平滑歯面に固着・集落化し虫歯誘発性バイオフィームを形成するのを抑制する作用を有する該酵素に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする虫歯予防剤である。

【0014】そして、前記GTF-Bとしては、以下の(a)又は(b)に示すアミノ酸配列からなるものが挙げられる。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加され、かつGTF-B活性を有するアミノ酸配列

【0015】また、上記モノクローナル抗体としては、GTF-Bの活性部位の1つである配列番号2記載のアミノ酸配列で表されるデキストラン結合領域を認識し結合するモノクローナル抗体、或いはGTF-Bの他の活性部位である配列番号3記載で表されるショ糖結合部位を含むペプチド断片を認識し結合するモノクローナル抗体が挙げられる。

【0016】さらに、上記モノクローナル抗体として、マウス-マウスハイブリドーマ MHP126 (FERM P-17566)により産生されるモノクローナル抗体、又はマウス-マウスハイブリドーマMHP136 (FERM P-17567)により産生されるモノクローナル抗体が挙げられる。

#### 【0017】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において、既得のGTF-B、-C及び-Dを各々単独発現するストレプトコッカス・ミレリ形質転換株を用いるショ糖依存性菌体固着・集落化試験を行なつて、虫歯誘発性バイオフィーム形成における3種のGTFの役割につき再検討を行った。その結果、GTF-Bを発現する株は、無処理又は唾液で被覆した平滑面には固着できないが、グルカンで被覆した表面には顕著に固着・集落化できることを見出した。通常のヒトの口腔内では、ペリクル面へ最初に付着する菌はストレプトコッカス・サンギスの仲間と考えられている。この菌群は主要なバイオフィーム構成菌の1つであり、菌体表層上に非付着性のグルカンを合成する能力があるため、ストレプトコッカス・ミュータンスは、GTF-Bの単独作用のみでその表面に固着・集落化できることになる。従って、実際の口腔内における虫歯誘発性バイオフィーム形成に最も重要な働きをする因子はGTF-Cではなく、GTF-Bであると考えられる。

【0018】従って、本発明の虫歯予防剤は、ストレプトコッカス・ミュータンスの最重要病原因子であるGTF-Bに特異的に反応し、該GTF-BのWIG合成活性を阻害するモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする。「ストレプトコッカス・ミュータンスが産生するGTF-B」には、ストレプトコッカス・ミュータンスに属する微生物が産生する限り、いかなる菌株が産生するGTF-Bも含まれる。

【0019】「ストレプトコッカス・ミュータンスが産生するGTF-B」の具体例としては、以下の(a)又は(b)に示すアミノ酸配列からなるGTF-Bを例示できる。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列

(b) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加され、かつGTF-B活性を有するアミノ酸配列

【0020】ここで、配列番号1記載のアミノ酸配列において欠失、置換又は付加されるアミノ酸の個数は、欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質がGTF-B活性を有する限り特に限定されないが、好ましくは1又は数個である。「1又は数個」とは、通常、本願の出願時において常用される技術、例えば、部位特異的変異誘発法(Nucleic Acids Res.10, 6487-6500, 1982)により生じさせることができる個数を意味する。

【0021】本発明の虫歯予防剤の有効成分であるモノクローナル抗体には、ストレプトコッカス・ミュータンスが産生するGTF-Bに特異的に反応し、該GTF-Bの非水溶性グルカン合成活性を阻害する限り、いかなるモノクローナル抗体も含まれる。

【0022】その中でも、以下の①～④に示すモノク

ーナル抗体を好ましいものとして例示できる。

① 以下の (a) 又は (b) に示すアミノ酸配列からなる GTF-B に特異的に反応し、該 GTF-B の WIG 合成活性を阻害するモノクローナル抗体。

(a) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列

(b) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加され、かつ GTF-B の活性を有するアミノ酸配列

② 前記 GTF-B の活性部位の 1 つである配列番号 2 記載のアミノ酸配列で表されるデキストラン結合領域を認識し結合するモノクローナル抗体。

【0023】③ 前記 GTF-B の他の活性部位である配列番号 3 記載で表されるショ糖結合部位を含むペプチド断片を認識し結合するモノクローナル抗体。

④ マウス-マウスハイブリドーマ MHP126 (FERM P-17566) により産生されるモノクローナル抗体、又はマウス-マウスハイブリドーマ MHP136 (FERM P-17567) により産生されるモノクローナル抗体である。

【0024】ここで、GTF-B が上記 (a) に示すアミノ酸配列からなる場合、上記②に示すモノクローナル抗体が特異的に反応する領域は配列番号 2 に示すアミノ酸配列で表される領域、或いは上記③に示すモノクローナル抗体が特異的に反応する領域は配列番号 3 に示すアミノ酸配列で表される領域である。

【0025】本発明の虫歯予防剤の有効成分であるモノクローナル抗体は、ストレプトコッカス・ミュータンスが産生する GTF-B に特異的に反応し、該 GTF-B の非水溶性グルカン合成活性を阻害するという性質に加え、ストレプトコッカス・ミュータンスが産生する GTF-D に反応しないという性質を併せ持つことが好ましく、ストレプトコッカス・ミュータンスが産生する GTF-C に反応しないという性質をさらに併せ持つことがさらに好ましい。

【0026】ストレプトコッカス・ミュータンスが産生する GTF-D 及び GTF-C には、ストレプトコッカス・ミュータンスに属する微生物が産生する限り、いかなる微生物が産生する GTF-D 及び GTF-C も含まれる。

【0027】ストレプトコッカス・ミュータンスが産生する GTF-D の具体例としては、以下の (c) 又は (d) に示すアミノ酸配列からなる GTF-D を例示できる。

(c) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列

(d) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列

また、ストレプトコッカス・ミュータンスが産生する GTF-C の具体例としては、以下の (e) 又は (f) に示すアミノ酸配列からなる GTF-C を例示できる。

【0028】(e) 配列番号 5 記載のアミノ酸配列

(f) 配列番号 5 記載のアミノ酸配列において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列

ここで、配列番号 4 及び 5 記載のアミノ酸配列において欠失、置換又は付加されるアミノ酸の個数の意義は、上記と同義である。

【0029】ストレプトコッカス・ミュータンスが産生する GTF-D に反応しないという性質と、ストレプトコッカス・ミュータンスが産生する GTF-C に反応しないという性質とを併せ持つモノクローナル抗体としては、上記②に示すモノクローナル抗体及び上記③に示すモノクローナル抗体を例示できる。

【0030】ストレプトコッカス・ミュータンスが産生する GTF-B に特異的に反応し、該 GTF-B の WIG 合成活性を阻害するモノクローナル抗体は、例えば、次の各工程により作成することができる。

(1) 抗原の調製

(2) 免疫及び抗体産生細胞の採取

(3) 細胞融合

(4) ハイブリドーマの選択及びクローニング

(5) モノクローナル抗体の採取

【0031】以下、各工程について説明する。

(1) 抗原の調製

抗原として使用する GTF-B 標品は、ストレプトコッカス・ミュータンスの野生株や変異株（不活性化遺伝子挿入法により g t f C や g t f D をノックアウトした U A 1 3 0 C D 株など）、全 g t f B を発現する形質転換株（大腸菌 S U 2 0 株やストレプトコッカス・ミレリ K S B 8 株など）、或いは g t f B の活性部位領域を発現する形質転換株の培養上清または菌体表層抽出物より精製することにより調製する。また活性部位領域と同一配列のペプチド断片を化学合成し、これを血清アルブミン等と結合させたものを抗原として用いる。

【0032】(2) 免疫及び抗体産生細胞の採取

抗原をマウス、ラット、ハムスター、モルモット又はウサギ等の哺乳動物（ヒト抗体を産生するように遺伝子工学的に作出されたヒト抗体産生マウスのようなトランスジェニック動物も含む）、好ましくはマウス、ラット又はハムスターの皮下内、筋肉内、静脈内、フットパッド内あるいは腹腔内に 1 ～ 数回注射することにより免疫感作を施し、通常、初回免疫から約 1 ～ 1 4 日毎に 1 ～ 4 回免疫を行い、最終免疫より約 1 ～ 5 日後に脾臓、リンパ節、骨髄あるいは扁桃等、好ましくは脾臓を摘出することにより行う。

【0033】(3) 細胞融合

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製は、ケーラー及びミルシュタインらの方法 (Nature, 256: 495-497, 1975) 及びそれに準じる修飾方法に従って行うことができるが、抗体産生細胞と、マウス、ラッ

ト、モルモット、ハムスター、ウサギ又はヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラット又はヒトに由来する自己抗体産生能のないミエローマ細胞とを細胞融合することにより調製される。ミエローマ細胞としては、例えばマウス由来ミエローマP3/X63-AG8.653(653)、P3/NS1/1-Ag4-1(NS-1)、P3/X63-Ag8.U1(P3U1)、SP2/O-Ag14(Sp2/O、Sp2)、PA1、FOあるいはBW5147、ラット由来ミエローマ210RCY3-Ag.2.3.、ヒト由来ミエローマU-266AR1、GM1500-6TG-A1-2、UC729-6、CEM-AGR、D1R11あるいはCEM-T15等を使用することができる。

#### 【0034】(4) ハイブリドーマの選択及びクローニング

ハイブリドーマの選択方法は通常の方法に従えばよく、例えば、選択培地(HAT培地など)を入れたマイクロタイタープレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清の前述の免疫感作で用いた抗原に対する反応性を、RIAやELISA等の酵素免疫測定法によって測定することにより行うことができる。GTF-Bに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、例えば、GTF-Bを用いたELISAによってスクリーニングできる。また、GTF-BのWIG合成活性を阻害するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、例えば、次のようにスクリーニングできる。GTF-B、ハイブリドーマ培養上清、リン酸カリウム緩衝液(pH6.0)及びアジ化ナトリウムを含有する混合物100~150 $\mu$ lを96穴マイクロプレートウェルに入れ、37℃で10~30分間ブレインキューベーション後、ショ糖含有リン酸カリウム緩衝液(pH6.0)20~50 $\mu$ lを加え、37℃で16~24時間インキューベーションする。インキューベーション後、反応プレートを黒紙上に置いてWIG合成による白濁形成の有無を判定することにより、活性阻害抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングする。目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをクローニングする方法は、通常の方法に従えば良く、特に限定されない。ハイブリドーマのクローニングは、例えば、限界希釈法、軟寒天法、フィブリンゲル法、蛍光励起セルソーター法等により行なうことができる。

#### 【0035】(5) モノクローナル抗体の採取

取得したハイブリドーマからのモノクローナル抗体の採取は、ハイブリドーマをインビトロ又はインビボ(マウス、ラット、モルモット、ハムスター若しくはウサギ等の腹水中等)で培養し、得られた培養上清又は哺乳動物の腹水から単離することにより行うことができる。インビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特異性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中に

モノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することができる。基本培地としては、例えば、Ham'F12培地、MCDB153培地あるいは低カルシウムMEM培地等の低カルシウム培地及びMCDB104培地、MEM培地、D-MEM培地、RPMI1640培地、ASF104培地あるいはRD培地等の高カルシウム培地等が挙げられ、該基本培地は、目的に応じて、例えば血清、ホルモン、サイトカイン及び/又は種々の無機若しくは有機物質等を含有することができる。モノクローナル抗体の単離及び精製は、上述の培養上清あるいは腹水を、飽和硫酸アンモニウム、ユーグロブリン沈殿法、カプロイン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー(DEAE又はDE52等)、抗イノグロブリンカラム又はプロテインAカラム等のアフィニティカラムクロマトグラフィーに供すること等により行うことができる。採取したモノクローナル抗体が目的とするモノクローナル抗体であることの確認は、例えば精製GTF-Bに対するELISA、ウェスタンブロット法及びWIG合成活性阻害測定(後述)により行うことができる。

【0036】本発明の虫歯予防剤の形態は、虫歯予防効果を発揮し得る限り特に限定されない。本発明の虫歯予防剤の形態としては、例えば、ハイブリドーマの培養上清、腹水抗体、精製抗体の凍結乾燥標品又はこれらを製剤化したものを例示できる。製剤化したものの具体例としては、散剤、顆粒剤、錠剤(例えばトローチ剤)、液剤、カプセル剤等を例示でき、これらの製剤化は常法に従って行なうことができる。散剤、顆粒剤及び錠剤は、例えば、凍結乾燥させた抗体をそのまま、又はこれに賦形剤、結合剤、崩壊剤等の適当な添加剤を加えて(さらに必要に応じて着色剤、芳香剤、矯味剤等を加えて)均等に混和した後、それぞれ適当な方法により粉末化、粒状化、圧縮成型することにより調製できる。液剤は、例えば、凍結乾燥させた抗体を溶剤に溶解し、必要に応じて安定剤、緩衝剤、矯味剤、ゲル化剤、保存剤等の適当な添加剤を加えることにより調製できる。液剤に使用する溶剤は、通常精製水又は常水(例えば、水道水、井水)である。本発明の虫歯予防剤は、対象動物の口内に投与する。本発明の虫歯予防剤は、単独で口内へ投与してもよいし、食物や食餌等に混合して口内へ投与してもよい。

【0037】本発明の虫歯予防剤の投与回数は特に限定されないが、通常1~3回/日であり、好ましくは1回/日である。本発明の虫歯予防剤の対象となる動物は、歯を有する動物である限り特に限定されず、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ハムスター、ウマ、ウシ、ブタ、等の多くの動物に対して虫歯予防効果を発揮し得る。

#### 【0038】

【実施例】次に、実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明する。

#### 実施例1 最重要GTFの特定

##### (1) 形質転換株の調製

既報 (Infect. Immun. 60: 2815-2822, 1992) に準じて作製したストレプトコッカス・ミレリKSB8形質転換株 (GTF-B発現株)、KSC43形質転換株 (GTF-C発現株) 及びNH5形質転換株 (GTF-D発現株) の凍結保存菌株より、発現量が高くかつ発現が安定なそれぞれの形質転換株を再分離して使用した。GTF蛋白の発現量と安定性は、先に本発明者らがモノクローナル抗体を使用して開発した各GTFの産生レベルをセミ分別定量するための免疫学的手法 (FEMS Microbiol. Lett. 145: 427-432, 1996) を用いて検定した。

##### 【0039】(2) 固着・集落化試験

ガラス製とポリスチレン製の非被覆、唾液被覆、及びグルカン被覆試験管 (9×75mm) を用いて形質転換株の固着・集落化能を下記の方法で比較検討した。成人5名からの加熱処理 (60℃、30分間) 混合唾液3mlを試験管に入れ、室温下で30分間インキュベーション後、唾液を除去し、十分に水洗したものを唾液被覆試験管とし

て用いた。グルカン被覆試験管は次のようにして調製した。ストレプトコッカス・ソプリヌスB13N株の培養上清から分離精製した純化GTF-Iの0.5μgと純化GTF-S2の0.25μg、50mMショ糖、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) からなる反応液3mlを試験管に入れ、37℃、30度傾斜下で16時間ローソク培養を行って付着性WIGを試験管壁上に形成させた後、パイプレーター処理により弱く付着したグルカンを洗浄除去した。

【0040】このようにして調製した唾液及びグルカン被覆試験管及び非被覆試験管に5%ショ糖添加THB培地2mlを入れ、オートクレーブ滅菌後、供試菌株の全培養菌1白金耳を植菌し、37℃、16時間、30度傾斜下でローソク培養を行った。培養後、試験管をタッチミキサーを用いてボルテックス処理 (最大スピード、10秒間) して非・弱付着菌体と固着菌体に分別し、それぞれの菌体量を550nmにおける濁度測定により求め、下記の式に従って固着率を算出した。

【0041】

【化1】

$$\text{固着率} = \frac{\text{固着菌体量}}{\text{固着菌体量} + \text{非・弱付着菌体量}} \times 100$$

【表1】

【0042】結果を表1に示す。

【0043】

#### ストレプトコッカス・ミレリ形質転換株の唾液被覆及びグルカン被覆

##### 試験管壁への固着・集落化能

試験管	固着率 (%)		
	KSB8株	KSC43株	NH5株
非被覆ガラス	0.24	34.80	0.30
非被覆ポリスチレン	3.07	56.40	0.52
唾液被覆ガラス	0.00	31.30	0.33
唾液被覆ポリスチレン	0.00	51.10	0.00
グルカン被覆ガラス	65.30	38.00	1.08
グルカン被覆ポリスチレン	72.50	58.80	1.20

【0044】表1の結果は、GTF-Bを発現するKSB8株は無処理又は唾液で被覆した平滑面には固着できないものの、グルカンで被覆した表面には顕著に固着・集落化できることを示している。一方、GTF-Cを発現するKSC43株はいずれの平滑面にも遜色なく固着・集落化できるのに対し、GTF-Dを発現するNH5株はいずれの平滑面にも全く固着できないことを示した。通常のヒト口腔内では、ペリクル面へ最初に付着する菌はストレプトコッカス・サンギスの仲間と考えられている。主要なバイオフィーム構成菌の1つである本菌群は、ショ糖から水溶性グルカン (WSG) を合成する一種類のGTFを菌体外及び菌体表層上に産生分泌する。従って、ストレプトコッカス・サンギスが初期

付着した固層表面にはショ糖存在下でストレプトコッカス・ミュータンスがGTF-Bの作用のみで固着・集落化できることになる。かくして、表1の結果は、実際の口腔内における虫歯誘発性バイオフィーム形成過程において最も重要な働きをする因子はGTF-Cではなく、GTF-Bであることを強く示唆している。

【0045】実施例2 モノクローナル抗体の作製  
以下の方法に従って、抗GTF-Bモノクローナル抗体を調製した。

##### (1) GTF-Bの調製

ストレプトコッカス・ミュータンスPS14株 (血清型C) (以下、単に「PS14株」という) からGTF-Bを以下のように調製した。PS14株を、1%硫酸ア



ンモニウム及び $10\mu\text{M}$  p-アミノフェニルメチルスルホンフルオリドを添加したM4培地の8L中で $37^\circ\text{C}$ にて18時間培養した後、培養液を遠心分離(8,000rpm, 10min)して、培養上清を回収した。この培養上清をPellicon cassette system (Millipore, Tokyo, Japan)で濃縮した後、硫酸アンモニウムを加えて飽和濃度を60%とした。一晩放置後、沈殿物を回収し、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)に溶解し、同緩衝液に対し透析した。ガラスカラム( $2.9\times 13\text{cm}$ )に充填後、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)で平衡化したカルボキシメチルセルロースのカラムに、得られた粗酵素を添加した。吸着した酵素を50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)で十分洗浄後、0~1Mの塩化ナトリウムを含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)で濃度勾配溶出させた。溶出パターンを波長280nmでの吸光度とWIG合成活性により観察した。約0.7Mの塩化ナトリウム濃度で溶出したフラクションがWIG合成活性を有しており、このフラクションを回収し、精製GTF-Bを取得した。

【0046】非水溶性グルカン合成活性は、フラクションにショ糖含有リン酸カリウム緩衝液を加え、 $37^\circ\text{C}$ で16時間インキュベーション後、反応混合物を超音波処理し、生成したWIGを分散させ、550nmの吸光度を分光光度計で測定した。測定された吸光度からWIG合成活性を算出した。

#### 【0047】(2) 免疫及び細胞融合

##### (i) 免疫動物脾臓細胞の調製

免疫方法は8~10週令のBALB/cマウスの皮下あるいは、静脈内あるいは腹腔内に、精製GTF-Bを適当なアジュバンド、例えば、フロインドアジュバンドあるいは、リビアジュバンドシステム(Ribi Adjuvant System, RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH, INC社(製)、販売: フナコシ(株))とともに注射することにより初回(0日)免疫した。初回免疫から14日目、28日目、42日目に精製GTF-Bを皮下あるいは腹腔内に注射することにより追加免疫し、更に下記に述べるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ調製の前々日及び前日にも同様にして最終免疫し、マウスから脾細胞を調製して細胞融合に用いた。

##### 【0048】(ii) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞P3-U1を正常培地「RPMI-1640にグルタミン $1.5\text{mM}$ 及び牛胎児血清10%を加えた培地」に培養( $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$ 、5%通気)し、4日後に $2\times 10^7$ 以上の細胞を得た。

##### 【0049】(iii) ハイブリドーマの作製

RPMI-1640(日本製薬社(製))でよく洗浄した免疫マウス脾細胞 $1\times 10^8$ 個とマウス骨髓腫細胞 $2\times 10^7$ 個を混合し、1500rpmで5分間遠心分離した。沈殿として得られた脾細胞とP3-U1の混合した

細胞群をほぐした後、攪拌しながら50%ポリエチレングリコール、10%DMSO溶液1mlを加え、2分後にRPMI-1640を徐々に加え、全容量が50mlとなるようにした。1000rpmで5分間遠心分離後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、HAT培地「上記正常培地にヒポキサンチン $10^{-4}\text{M}$ 、チミジン $1.5\times 10^{-5}\text{M}$ 、及びアミノプテリン $4\times 10^{-7}\text{M}$ を加えた培地」30mlを加え、5ml溶メスピペットでゆるやかに細胞を懸濁し、5% $\text{CO}_2$ インキュベーター中 $37^\circ\text{C}$ で2時間培養した。1500rpmで5分間遠心分離後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、HAT培地に懸濁し、96穴培養プレートに $200\mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、5% $\text{CO}_2$ インキュベーター中 $37^\circ\text{C}$ で10~14日間培養した。

【0050】(3) ハイブリドーマのスクリーニング  
抗GTF-Bモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングは、抗原を固相化したELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)を用いて行った。また、得られた抗体産生ハイブリドーマの中からGTF-BのWIG合成活性を阻害するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングは、96穴EIAプレートをを用いてWIG合成阻害に伴う濁度減少を調べるにより行った。

【0051】精製GTF-Bを150mMのNaClを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.4、以下「PBS」という)に $2\mu\text{g/ml}$ の濃度で調製後、96穴EIAプレートに $50\mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、室温で2時間放置し抗原をプレートに固相化した。0.05%のTween 20を含むPBS(以下「T-PBS」という)を350 $\mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、室温で1時間放置し底面上の蛋白結合性残基をブロックした。96穴EIAをT-PBSにより2回洗浄後、T-PBSをプレートに $50\mu\text{l}$ /穴、さらに1次抗体としてハイブリドーマ培養上清を100 $\mu\text{l}$ /穴ずつ添加し、 $4^\circ\text{C}$ で一晩又は室温で2時間放置した。EIAプレートをT-PBSにより2回洗浄後、第2抗体としてヤギの抗マウスIgGグロブリン-ペルオキシダーゼ結合物(TAGO社(製)、販売: コスモバイオ(株))の5000倍希釈液を $50\mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、室温で1時間放置した。EIAプレートをT-PBSにより2回洗浄後、OPD基質液(o-フェニレンジアミン2塩酸塩60mgをクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.2)20mlに溶かした溶液に、30%の過酸化水素 $20\mu\text{l}$ を加えた溶液)を $50\mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、発色後、1Nの硫酸溶液を $50\mu\text{l}$ /穴ずつ分注し反応を停止させた。プレートリーダーにて吸光度を主波長492nm、副波長620nmで測定した。

【0052】次に、上記ELISA反応に強陽性を示す培養上清についてGTF-BのWIG合成活性に対する阻害能の有無を、ストレプトコッカス・ミレリKS88形質転換株の培養上清から調製したGTF-Bの粗酵素標品

(調製法は後述)を用いて調べた。96穴EIAプレートの各穴に粗酵素50 $\mu$ l(約1mU)とハイブリドーマ上清50 $\mu$ lを添加し、室温に20分間放置後、300mMショ糖25 $\mu$ lと0.6Mリン酸緩衝液(pH6.0)25 $\mu$ lを加え、37℃のインキュベーター中で16時間反応させた。WIG合成に伴う濁度形成の認められない透明穴形成を指標にしてスクリーニングし、WIG合成阻害能を持つ抗体産生ハイブリドーマを数種取得した。

【0053】これらハイブリドーマについて限外希釈法によるクローニングを2～4回繰り返して、安定して抗体産生の認められた2株を抗GTF-Bモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択し、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に、寄託番号FERM P-17566及びFERM P-17567として寄託した。

#### 【0054】(4)モノクローナル抗体の調製

このようにして得られたハイブリドーマFERM P-17566及びFERM P-17567を10%牛胎児血清加RPMI 1640培地に4～6日間培養した。その培養上清を集め、0.1%アジ化ナトリウム存在下で冷蔵、或いは直ちに凍結乾燥したものを調製し、培養上清画分として用いた。さらに、冷蔵保蔵した培養上清画分(約1リットル)に硫酸アンモニウムを50%飽和になるよう添加し、一晩放置後、生じた沈殿物を遠心分離にて回収した。この沈殿物を生理食塩水に溶解し、同液に対して4℃下で2日間透析後、凍結乾燥し、これを粗免疫グロブリン画分として用いた。なお、FERM P-17566から得られたモノクローナル抗体をMHP 126と命名し、FERM P-17567から得られたモノクローナル抗体をMHP 136と命名した。

#### 【0055】実施例3 モノクローナル抗体の反応性

#### (1) GTF-B、GTF-C及びGTF-Dに対する反応性

得られた2種のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体について、GTF-B、GTF-C及びGTF-Dとの反応性をELISA及びウエスタンブロッティングによって調べた。反応性試験及び次の活性阻害試験に使用するGTF-B抗原及び反応性試験に使用するGTF-C抗原は、ストレプトコッカス・ミレリKSB8株及びKSC43株の培養上清より部分精製したリコンビナント酵素標品を下記のように調製し使用した。既報(Infect. Immun. 60:2815-2822, 1992)の方法で作製したKSB8株及びKSC43株をエリスロマイシン(10 $\mu$ g/ml)及び10 $\mu$ M p-APMSFを添加したTHB培地中で37℃にて18時間嫌気培養し、遠心分離によりそれぞれの培養上清を回収後、リコンビナントGTF-Bは硫酸アンモニウム沈殿、ハイドロキシルアパタイト及びトヨパールHW55のカラムクロマトグラフィー処理により、リコンビナントGTF-Cは硫酸アンモニウム沈殿及びトヨパールHW65の疎水カラムクロマトグラフィー処理により部分精製した。また、反応性試験に使用するGTF-D抗原は、ストレプトコッカス・ミュータンスPS14株の透析BHI培地培養上清より、馬場らの方法(Carbohydr. Res. 158:147-155, 1986)に準じて、硫酸アンモニウム沈殿、DEAEセルロース及びCMセルロースのカラムクロマトグラフィー処理を行なって得た純化標品を使用した。このようにして調製したGTF-BとGTF-Cのリコンビナント酵素、及びGTF-Dの純化酵素に対するモノクローナル抗体MHP 126とMHP 136の反応性を、上記と同様の方法で調べたELISAの結果を表2に示す。

#### 【0056】

【表2】

抗 体	免 疫 反 応 性		
	GTF-B	GTF-C	GTF-D
モノクローナル抗体 MHP 126	++	—	—
モノクローナル抗体 MHP 136	+++	—	—

【0057】表2中の「+++」は吸光度が1.5以上、「++」は吸光度が0.7以上、「—」は吸光度が0.2未満であったことを示す。吸光度が大きい値であるほど、抗体のGTF-Bに対する反応性が大きい。従って、モノクローナル抗体のGTF-Bに対する反応性は「+++」>「++」>「+」>「—」という関係で表される。

【0058】表2の結果は、モノクローナル抗体MHP 126とMHP 136とは、GTF-Bのみと強く反応し、GTF-C及びGTF-Dには全く反応しないこと

を示している。なお、両抗体のGTF-Bに対する反応特異性はウエスタンブロッティングによっても確認された。

#### 【0059】(2) GTF-BのWIG合成活性の阻害能

リコンビナントGTF-Bの部分精製標品(6mU)、粗免疫グロブリン画分(10～50 $\mu$ g)、100mMリン酸緩衝液(pH 6.0)及び0.01%アジ化ナトリウムからなる反応液(625 $\mu$ l)を37℃で10分間ブレインキュベーションした後、300mMショ糖含有100mMリン酸緩衝液(pH6.0)を125 $\mu$

1加えた。37℃下で16時間インキュベーションした後、反応液を超音波処理（50W、3秒間）し、生成したWIGを分散させ、550nmの濁度を分光光度計で測定した。未培養の培地50μlを添加した反応液の濁度に対する百分

率を求め、それを阻害率とした。その結果を表3に示す。

【0060】

【表3】

抗体 及び 添加量		阻 害 率
MHP 1 2 6 抗体	10μl	46.3%
	25μl	68.8%
	50μl	72.6%
MHP 1 3 6 抗体	10μl	68.9%
	25μl	85.2%
	50μl	89.5%

【0061】表3の結果が示すように、MHP 1 2 6及びMHP 1 3 6モノクローナル抗体はいずれもGTF-BのWIG合成活性を著明に阻害することが確認された。

### （3）抗原認識部位の推定

MHP 1 2 6及びMHP 1 3 6モノクローナル抗体の抗原認識部位を推定する目的で、GTF-BのC末端領域（デキストラン結合領域）を欠落した不完全GTFに対する両モノクローナル抗体の反応性を上記と同様にEL

ISAにより調べた。C末端領域を欠落したGTFタンパク抗原は、加藤ら（FEBS Microbiol. Let. 72:298-302, 1990）が構築した大腸菌クローンpCK41の培養菌体からの菌体抽出物を調製し使用した。また、KSB8株培養上清から部分精製したリコンビナントGTF-B標品を対照抗原として用いた。結果を表4に示す

【0062】

【表4】

抗 体	抗 原	
	pCK41抽出物	精製GTF-B
MHP 1 2 6	+	++
MHP 1 3 6	-	+++

【0063】表4中の「+++」は吸光度が1.5以上、「++」は吸光度が0.7以上、「-」は吸光度が0.2未満であったことを示す。表4の結果から、モノクローナル抗体MHP 1 2 6は、pCK41抽出物及び精製GTF-Bの両抗原と反応したので、MHP 1 2 6の抗原認識部位はN末端側活性部位、すなわち配列番号2記載のアミノ酸で表される領域に存在することが推測された。一方、モノクローナル抗体MHP 1 3 6は、pCK41とは全く反応せず、精製GTF-Bとのみ反応した。MHP 1 3 6の抗原認識部位はデキストラン結合部位、すなわち配列番号3記載のアミノ酸配列で表される領域に存在することが推測された。

### 【0064】（4）アイソタイプの決定

マウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定キット（ZYMED社（製）、販売：コスモバイオ（株））を用い、該キット添付の実験操作プロトコールに従って操作を行い、モノクローナル抗体MHP 1 2 6及びMHP 1 3 6のアイソタイプを決定した。MHP 1 2 6及びMHP 1 3 6抗体のアイソタイプは共にIgG<sub>1</sub>であった。

### 【0065】実施例4 モノクローナル抗体MHP 1 2

6及びMHP 1 3 6の虫歯予防効果

### （1）虫歯誘発性バイオフィルムの形成阻害能

上述の固着・集落化試験法に準じた方法で、MHP 1 2 6及びMHP 1 3 6の培養上清抗体を用いて虫歯誘発性バイオフィルム形成に対する阻害能を評価した。即ち、生食水に対し一夜透析し、ろ過滅菌した培養上清抗体を50～400μl、0.5%ショ糖および0.5%ブドウ糖を含むTHB培地2mlを小ガラス試験管に入れ、ストレプトコッカス・ミュータンスPS14株の前培養菌を1白金耳を植菌し、37℃、16時間、30度傾斜下でローソク培養を行った。培養後、試験管をタッチミキサーを用いてボルテックス処理（10秒間）し、非・弱付着菌体と固着菌体に分別後、それぞれの菌体量を550nmにおける濁度測定した。上述した計算式により固着率を求め、ストレプトコッカス・ソブリヌスのGTF-Tに対するマウスモノクローナル抗体（B19）を産生するハイブリドーマ培養上清添加の培養系（対照）の固着率との比より阻害率を算出した。結果を表5に示す。

【0066】

【表5】

添加抗体	量	固着率	阻害率
B 1 9 抗体	400 $\mu$ l	47.74%	0.0%
MHP 1 2 6 抗体	50 $\mu$ l	18.88%	60.5%
	100 $\mu$ l	17.16%	64.1%
	200 $\mu$ l	16.16%	66.1%
	400 $\mu$ l	18.10%	62.1%
MHP 1 3 6 抗体	50 $\mu$ l	24.87%	47.9%
	100 $\mu$ l	18.99%	60.2%
	200 $\mu$ l	19.17%	59.8%
	400 $\mu$ l	18.62%	61.0%

【0067】表5の結果は、MHP 1 2 6及びMHP 1 3 6の両モノクローナル抗体が、ストレプトコッカス・ミュータンスPS 1 4株の平滑面への固着・集落化、即ち虫歯誘発性バイオフィーム形成を著明に阻害する作用を持つことを強く示唆する。

【0068】(2)感染ラットに対する虫歯発生抑制能GTF-BのWIG合成活性を阻害するモノクローナル抗体の口腔内投与で虫歯発生を抑制出来るか否かを、ストレプトコッカス・ミュータンスPS 1 4株、モノクローナル抗体MHP 1 2 6の粗免疫グロブリン画分、35%ショ糖含有虫歯誘発食及びSD系ラットを用いた下記の動物実験により調べた。その目的のため、以下のような実験群を設定した。

#### 【0069】①グループA

ストレプトコッカス・ミュータンスに感染していない20日令ラット(6匹)に、モノクローナル抗体を含まない35%ショ糖食を与えて飼育する。

#### ②グループB

ストレプトコッカス・ミュータンスPS 1 4株を20日令ラット(6匹)に感染させ、モノクローナル抗体を含まない35%ショ糖食を与えて飼育する。

#### 【0070】③グループC

ストレプトコッカス・ミュータンスPS 1 4株を20日令ラット(6匹)に感染させ、モノクローナル抗体MHP 1 2 6(凍結乾燥標品)を0.01%(w/w)濃度に添加した35%ショ糖食を与えて飼育する。グループA～Cの実験群において、上記の食餌を自由摂取にて57日間与えて飼育後、77日令で屠殺し、下顎に発生した虫歯の程度をカイズの方法(J. Dent. Res. 23:439-444, 1944)によりスコア化し、比較した。グループA～Cにおける結果をそれぞれ表6～8に示す。

#### 【0071】

#### 【表6】

#### グループA群ラットの虫歯スコア

ラット	平滑面虫歯	裂溝面虫歯	隣接面虫歯	合計
1	0	6	0	6
2	0	11	0	11
3	0	8	0	8
4	0	9	0	9
5	0	8	0	8
平均	0	8	0	8

#### 【0072】

#### 【表7】

グループB群ラットの虫歯スコア

ラット	平滑面虫歯	裂溝面虫歯	隣接面虫歯	合計
1	1 4	5 5	3	7 2
2	1 5	6 0	4	7 9
3	2 0	6 5	0	8 5
4	1 5	7 2	4	9 1
5	1 0	6 1	0	7 1
6	1 5	6 7	3	8 5
7	2 0	8 2	4	1 0 6
平均	1 6	6 6	3	8 5

【0073】

【表8】

グループC群ラットの虫歯スコア

ラット	平滑面虫歯	裂溝面虫歯	隣接面虫歯	合計
1	7	5 2	1	6 0
2	8	5 6	0	6 4
3	5	4 8	3	5 6
4	6	4 7	0	5 3
5	5	6 2	3	7 0
6	4	4 6	4	5 4
平均	6	5 2	2	6 0

【0074】表6及び表7に示されるように、グループBではグループAよりもスコア（虫歯の発生率）が有意に高かった。グループA及びグループBで与えられた食餌は同じであるので、このようなスコアの違いは、ストレプトコッカス・ミュータンスPS14株の感染の有無に基づく。すなわち、グループAではPS14株を感染させていないので虫歯の発生率は低いが、グループBではPS14株を感染させているので虫歯の発生率がグループAよりも有意（ $P < 0.01$ ）に高い。このことから、ストレプトコッカス・ミュータンス株が虫歯を誘発する原因であることは明らかである。

【0075】一方、表7及び表8に示されるように、グループCではグループBよりも虫歯の発生率、特に平滑面虫歯の発生率が有意（ $P < 0.01$ ）に低かった。グループB及びグループCではともにストレプトコッカス・ミュータンスPS14株を感染させているので、このような虫歯発生率の相違は、与えられた食餌の相違に基づく。グループBでは、モノクローナル抗体MHP126を含まない食餌が与えられたので虫歯の発生率が高い

が、グループCでは、モノクローナル抗体MHP126を含む食餌が与えられたので虫歯の発生率がグループBよりも有意に低くなっている。このことは、モノクローナル抗体MHP126にストレプトコッカス・ミュータンスによる虫歯の発生を予防する効果があることを示している。すなわち、モノクローナル抗体MHP126やMHP136のように、ストレプトコッカス・ミュータンスが産生するGTF-Bに特異的に反応し、該GTF-BのWIG合成活性を阻害するモノクローナル抗体が虫歯予防効果を有することが明らかとなった。

【0076】

【発明の効果】本発明により、ストレプトコッカス・ミュータンスが産生するGTF-Bに特異的に反応し、該GTF-BのWIG合成活性を阻害するモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする虫歯予防剤が提供される。

【0077】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>; NIHON UNIVERSITY  
 <120>; A medicament for dental prophylaxis  
 <130>; P99-0389  
 <140>;  
 <141>;  
 <160>; 6

<;170>; PatentIn Ver. 2.0

<;210>; 1

<;211>; 1476

<;212>; PRT

<;213>; Streptococcus mutans

<;400>; 1

Met Asp Lys Lys Val Arg Tyr Lys Leu Arg Lys Val Lys Lys Arg Trp  
1 5 10 15  
Val Thr Val Ser Val Ala Ser Ala Val Met Thr Leu Thr Thr Leu Ser  
20 25 30  
Gly Gly Leu Val Lys Ala Asp Ser Asn Glu Ser Lys Ser Gln Ile Ser  
35 40 45  
Asn Asp Ser Asn Thr Ser Val Val Thr Ala Asn Glu Glu Ser Asn Val  
50 55 60  
Ile Thr Glu Ala Thr Ser Lys Gln Glu Ala Ala Ser Ser Gln Thr Asn  
65 70 75 80  
His Thr Val Thr Thr Ser Ser Ser Ser Thr Ser Val Val Asn Pro Lys  
85 90 95  
  
Glu Val Val Ser Asn Pro Tyr Thr Val Gly Glu Thr Ala Ser Asn Gly  
100 105 110  
Glu Lys Leu Gln Asn Gln Thr Thr Thr Val Asp Lys Thr Ser Glu Ala  
115 120 125  
Ala Ala Asn Asn Ile Ser Lys Gln Thr Thr Glu Ala Asp Thr Asp Val  
130 135 140  
Ile Asp Asp Ser Asn Ala Ala Asn Leu Gln Ile Leu Glu Lys Leu Pro  
145 150 155 160  
Asn Val Lys Glu Ile Asp Gly Lys Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Asn Asn Gly  
165 170 175  
Lys Val Arg Thr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Asp Gly Lys Ile Leu His  
180 185 190  
Phe Asp Glu Thr Gly Ala Tyr Thr Asp Thr Ser Ile Asp Thr Val Asn  
195 200 205  
Lys Asp Ile Val Thr Thr Arg Ser Asn Leu Tyr Lys Lys Tyr Asn Gln  
210 215 220  
Val Tyr Asp Arg Ser Ala Gln Ser Phe Glu His Val Asp His Tyr Leu  
225 230 235 240  
Thr Ala Glu Ser Trp Tyr Arg Pro Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Gly Lys  
245 250 255  
  
Thr Trp Thr Gln Ser Thr Glu Lys Asp Phe Arg Pro Leu Leu Met Thr  
260 265 270  
Trp Trp Pro Asp Gln Glu Thr Gln Arg Gln Tyr Val Asn Tyr Met Asn  
275 280 285  
Ala Gln Leu Gly Ile Asn Lys Thr Tyr Asp Asp Thr Ser Asn Gln Leu  
290 295 300  
Gln Leu Asn Ile Ala Ala Ala Thr Ile Gln Ala Lys Ile Glu Ala Lys  
305 310 315 320  
Ile Thr Thr Leu Lys Asn Thr Asp Trp Leu Arg Gln Thr Ile Ser Ala  
325 330 335

Phe Val Lys Thr Gln Ser Ala Trp Asn Ser Asp Ser Glu Lys Pro Phe  
340 345 350  
Asp Asp His Leu Gln Asn Gly Ala Val Leu Tyr Asp Asn Glu Gly Lys  
355 360 365  
Leu Thr Pro Tyr Ala Asn Ser Asn Tyr Arg Ile Leu Asn Arg Thr Pro  
370 375 380  
Thr Asn Gln Thr Gly Lys Lys Asp Pro Arg Tyr Thr Ala Asp Asn Thr  
385 390 395 400  
Ile Gly Gly Tyr Glu Phe Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn  
405 410 415  
Pro Val Val Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu His Phe Leu Met Asn  
420 425 430  
Phe Gly Asn Ile Tyr Ala Asn Asp Pro Asp Ala Asn Phe Asp Ser Ile  
435 440 445  
Arg Val Asp Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala  
450 455 460  
Gly Asp Tyr Leu Lys Ala Ala Lys Gly Ile His Lys Asn Asp Lys Ala  
465 470 475 480  
Ala Asn Asp His Leu Ser Ile Leu Glu Ala Trp Ser Asp Asn Asp Thr  
485 490 495  
Pro Tyr Leu His Asp Asp Gly Asp Asn Met Ile Asn Met Asp Asn Lys  
500 505 510  
Leu Arg Leu Ser Leu Leu Phe Ser Leu Ala Lys Pro Leu Asn Gln Arg  
515 520 525  
Ser Gly Met Asn Pro Leu Ile Thr Asn Ser Leu Val Asn Arg Thr Asp  
530 535 540  
Asp Asn Ala Glu Thr Ala Ala Val Pro Ser Tyr Ser Phe Ile Arg Ala  
545 550 555 560  
  
His Asp Ser Glu Val Gln Asp Leu Ile Arg Asp Ile Ile Lys Ala Glu  
565 570 575  
Ile Asn Pro Asn Val Val Gly Tyr Ser Phe Thr Met Glu Glu Ile Lys  
580 585 590  
Lys Ala Phe Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Ala Thr Glu Lys Lys  
595 600 605  
Tyr Thr His Tyr Asn Thr Ala Leu Ser Tyr Ala Leu Leu Leu Thr Asn  
610 615 620  
Lys Ser Ser Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Met Phe Thr Asp Asp  
625 630 635 640  
Gly Gln Tyr Met Ala His Lys Thr Ile Asn Tyr Glu Ala Ile Glu Thr  
645 650 655  
Leu Leu Lys Ala Arg Ile Lys Tyr Val Ser Gly Gly Gln Ala Met Arg  
660 665 670  
Asn Gln Gln Val Gly Asn Ser Glu Ile Ile Thr Ser Val Arg Tyr Gly  
675 680 685  
Lys Gly Ala Leu Lys Ala Thr Asp Thr Gly Asp Arg Thr Thr Arg Thr  
690 695 700  
Ser Gly Val Ala Val Ile Glu Gly Asn Asn Pro Ser Leu Arg Leu Lys  
705 710 715 720

Ala Ser Asp Arg Val Val Val Asn Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln			
725	730	735	
Ala Tyr Arg Pro Leu Leu Leu Thr Thr Asp Asn Gly Ile Lys Ala Tyr			
740	745	750	
His Ser Asp Gln Glu Ala Ala Gly Leu Val Arg Tyr Thr Asn Asp Arg			
755	760	765	
Gly Glu Leu Ile Phe Thr Ala Ala Asp Ile Lys Gly Tyr Ala Asn Pro			
770	775	780	
Gln Val Ser Gly Tyr Leu Gly Val Trp Val Pro Val Gly Ala Ala Ala			
785	790	795	800
Asp Gln Asp Val Arg Val Ala Ala Ser Thr Ala Pro Ser Thr Asp Gly			
805	810	815	
Lys Ser Val His Gln Asn Ala Ala Leu Asp Ser Arg Val Met Phe Glu			
820	825	830	
Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Lys Lys Glu Tyr Thr			
835	840	845	
Asn Val Val Ile Ala Lys Asn Val Asp Lys Phe Ala Glu Trp Gly Val			
850	855	860	
Thr Asp Phe Glu Met Ala Pro Gln Tyr Val Ser Ser Thr Asp Gly Ser			
865	870	875	880
Phe Leu Asp Ser Val Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr			
885	890	895	
Asp Leu Gly Ile Ser Lys Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Asp Leu			
900	905	910	
Val Lys Ala Ile Lys Ala Leu His Ser Lys Gly Ile Lys Val Met Ala			
915	920	925	
Asp Trp Val Pro Asp Gln Met Tyr Ala Phe Pro Glu Lys Glu Val Val			
930	935	940	
Thr Ala Thr Arg Val Asp Lys Tyr Gly Thr Pro Val Ala Gly Ser Gln			
945	950	955	960
Ile Lys Asn Thr Leu Tyr Val Val Asp Gly Lys Ser Ser Gly Lys Asp			
965	970	975	
Gln Gln Ala Lys Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Glu Glu Leu Gln Ala Lys			
980	985	990	
Tyr Pro Glu Leu Phe Ala Arg Lys Gln Ile Ser Thr Gly Val Pro Met			
995	1000	1005	
Asp Pro Ser Val Lys Ile Lys Gln Trp Ser Ala Lys Tyr Phe Asn Gly			
1010	1015	1020	
Thr Asn Ile Leu Gly Arg Gly Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gln Ala			
1025	1030	1035	1040
Thr Asn Thr Tyr Phe Asn Ile Ser Asp Asn Lys Glu Ile Asn Phe Leu			
1045	1050	1055	
Pro Lys Thr Leu Leu Asn Gln Asp Ser Gln Val Gly Phe Ser Tyr Asp			
1060	1065	1070	
Gly Lys Gly Tyr Val Tyr Tyr Ser Thr Ser Gly Tyr Gln Ala Lys Asn			
1075	1080	1085	
Thr Phe Ile Ser Glu Gly Asp Lys Trp Tyr Tyr Phe Asp Asn Asn Gly			
1090	1095	1100	
Tyr Met Val Thr Gly Ala Gln Ser Ile Asn Gly Val Asn Tyr Tyr Phe			



1105	1110	1115	1120
Leu Ser Asn Gly	Leu Gln Leu Arg Asp Ala	Ile Leu Lys Asn Glu Asp	
	1125	1130	1135
Gly Thr Tyr Ala Tyr Tyr Gly Asn Asp Gly Arg Arg Tyr Glu Asn Gly			
	1140	1145	1150
Tyr Tyr Gln Phe Met Ser Gly Val Trp Arg His Phe Asn Asn Gly Glu			
	1155	1160	1165
Met Ser Val Gly Leu Thr Val Ile Asp Gly Gln Val Gln Tyr Phe Asp			
	1170	1175	1180
Glu Met Gly Tyr Gln Ala Lys Gly Lys Phe Val Thr Thr Ala Asp Gly			
1185	1190	1195	1200
Lys Ile Arg Tyr Phe Asp Lys Gln Ser Gly Asn Met Tyr Arg Asn Arg			
	1205	1210	1215
Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gly Lys Trp Leu Tyr Leu Gly Glu Asp Gly			
	1220	1225	1230
Ala Ala Val Thr Gly Ser Gln Thr Ile Asn Gly Gln His Leu Tyr Phe			
	1235	1240	1245
Arg Ala Asn Gly Val Gln Val Lys Gly Glu Phe Val Thr Asp His His			
	1250	1255	1260
Gly Arg Ile Ser Tyr Tyr Asp Gly Asn Ser Gly Asp Gln Ile Arg Asn			
1265	1270	1275	1280
Arg Phe Val Arg Asn Ala Gln Gly Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Asn Asn			
	1285	1290	1295
Gly Tyr Ala Val Thr Gly Ala Arg Thr Ile Asn Gly Gln His Leu Tyr			
	1300	1305	1310
Phe Arg Ala Asn Gly Val Gln Val Lys Gly Glu Phe Val Thr Asp Arg			
	1315	1320	1325
Tyr Gly Arg Ile Ser Tyr Tyr Asp Gly Asn Ser Gly Asp Gln Ile Arg			
	1330	1335	1340
Asn Arg Phe Val Arg Asn Ala Gln Gly Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Asn			
1345	1350	1355	1360
Asn Gly Tyr Ala Val Thr Gly Ala Arg Thr Ile Asn Gly Gln His Leu			
	1365	1370	1375
Tyr Phe Arg Ala Asn Gly Val Gln Val Lys Gly Glu Phe Val Thr Asp			
	1380	1385	1390
Arg His Gly Arg Ile Ser Tyr Tyr Asp Gly Asn Ser Gly Asp Gln Ile			
	1395	1400	1405
Arg Asn Arg Phe Val Arg Asn Ala Gln Gly Gln Trp Phe Tyr Phe Asp			
	1410	1415	1420
Asn Asn Gly Tyr Ala Val Thr Gly Ala Arg Thr Ile Asn Gly Gln His			
1425	1430	1435	1440
Leu Tyr Phe Arg Ala Asn Gly Val Gln Val Lys Gly Glu Phe Val Thr			
	1445	1450	1455
Asp Arg Tyr Gly Arg Ile Ser Tyr Tyr Asp Ala Asn Ser Gly Glu Arg			
	1460	1465	1470
Val Arg Ile Asn			
	1475		

<;210>; 2

<;211>; 1017

<;212>; PRT

<;213>; Streptococcus mutans

<;400>; 2

Leu Val Lys Ala Asp Ser Asn Glu Ser Lys Ser Gln Ile Ser Asn Asp  
1 5 10 15  
Ser Asn Thr Ser Val Val Thr Ala Asn Glu Glu Ser Asn Val Ile Thr  
20 25 30  
Glu Ala Thr Ser Lys Gln Glu Ala Ala Ser Ser Gln Thr Asn His Thr  
35 40 45  
Val Thr Thr Ser Ser Ser Ser Thr Ser Val Val Asn Pro Lys Glu Val  
50 55 60  
Val Ser Asn Pro Tyr Thr Val Gly Glu Thr Ala Ser Asn Gly Glu Lys  
65 70 75 80  
Leu Gln Asn Gln Thr Thr Thr Val Asp Lys Thr Ser Glu Ala Ala Ala  
85 90 95  
Asn Asn Ile Ser Lys Gln Thr Thr Glu Ala Asp Thr Asp Val Ile Asp  
100 105 110  
Asp Ser Asn Ala Ala Asn Leu Gln Ile Leu Glu Lys Leu Pro Asn Val  
115 120 125  
Lys Glu Ile Asp Gly Lys Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Asn Asn Gly Lys Val  
130 135 140  
Arg Thr Asn Phe Thr Leu Ile Ala Asp Gly Lys Ile Leu His Phe Asp  
145 150 155 160  
Glu Thr Gly Ala Tyr Thr Asp Thr Ser Ile Asp Thr Val Asn Lys Asp  
165 170 175  
Ile Val Thr Thr Arg Ser Asn Leu Tyr Lys Lys Tyr Asn Gln Val Tyr  
180 185 190  
Asp Arg Ser Ala Gln Ser Phe Glu His Val Asp His Tyr Leu Thr Ala  
195 200 205  
Glu Ser Trp Tyr Arg Pro Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Gly Lys Thr Trp  
210 215 220  
Thr Gln Ser Thr Glu Lys Asp Phe Arg Pro Leu Leu Met Thr Trp Trp  
225 230 235 240  
Pro Asp Gln Glu Thr Gln Arg Gln Tyr Val Asn Tyr Met Asn Ala Gln  
245 250 255  
Leu Gly Ile Asn Lys Thr Tyr Asp Asp Thr Ser Asn Gln Leu Gln Leu  
260 265 270  
  
Asn Ile Ala Ala Ala Thr Ile Gln Ala Lys Ile Glu Ala Lys Ile Thr  
275 280 285  
Thr Leu Lys Asn Thr Asp Trp Leu Arg Gln Thr Ile Ser Ala Phe Val  
290 295 300  
Lys Thr Gln Ser Ala Trp Asn Ser Asp Ser Glu Lys Pro Phe Asp Asp  
305 310 315 320  
His Leu Gln Asn Gly Ala Val Leu Tyr Asp Asn Glu Gly Lys Leu Thr  
325 330 335  
Pro Tyr Ala Asn Ser Asn Tyr Arg Ile Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn  
340 345 350

Gln Thr Gly Lys Lys Asp Pro Arg Tyr Thr Ala Asp Asn Thr Ile Gly  
 355 360 365  
 Gly Tyr Glu Phe Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val  
 370 375 380  
 Val Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu His Phe Leu Met Asn Phe Gly  
 385 390 395 400  
 Asn Ile Tyr Ala Asn Asp Pro Asp Ala Asn Phe Asp Ser Ile Arg Val  
 405 410 415  
 Asp Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Gly Asp  
 420 425 430  
  
 Tyr Leu Lys Ala Ala Lys Gly Ile His Lys Asn Asp Lys Ala Ala Asn  
 435 440 445  
 Asp His Leu Ser Ile Leu Glu Ala Trp Ser Asp Asn Asp Thr Pro Tyr  
 450 455 460  
 Leu His Asp Asp Gly Asp Asn Met Ile Asn Met Asp Asn Lys Leu Arg  
 465 470 475 480  
 Leu Ser Leu Leu Phe Ser Leu Ala Lys Pro Leu Asn Gln Arg Ser Gly  
 485 490 495  
 Met Asn Pro Leu Ile Thr Asn Ser Leu Val Asn Arg Thr Asp Asp Asn  
 500 505 510  
 Ala Glu Thr Ala Ala Val Pro Ser Tyr Ser Phe Ile Arg Ala His Asp  
 515 520 525  
 Ser Glu Val Gln Asp Leu Ile Arg Asp Ile Ile Lys Ala Glu Ile Asn  
 530 535 540  
 Pro Asn Val Val Gly Tyr Ser Phe Thr Met Glu Glu Ile Lys Lys Ala  
 545 550 555 560  
 Phe Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Ala Thr Glu Lys Lys Tyr Thr  
 565 570 575  
 His Tyr Asn Thr Ala Leu Ser Tyr Ala Leu Leu Leu Thr Asn Lys Ser  
 580 585 590  
 Ser Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Met Phe Thr Asp Asp Gly Gln  
 595 600 605  
 Tyr Met Ala His Lys Thr Ile Asn Tyr Glu Ala Ile Glu Thr Leu Leu  
 610 615 620  
 Lys Ala Arg Ile Lys Tyr Val Ser Gly Gly Gln Ala Met Arg Asn Gln  
 625 630 635 640  
 Gln Val Gly Asn Ser Glu Ile Ile Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Gly  
 645 650 655  
 Ala Leu Lys Ala Thr Asp Thr Gly Asp Arg Thr Thr Arg Thr Ser Gly  
 660 665 670  
 Val Ala Val Ile Glu Gly Asn Asn Pro Ser Leu Arg Leu Lys Ala Ser  
 675 680 685  
 Asp Arg Val Val Val Asn Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr  
 690 695 700  
 Arg Pro Leu Leu Leu Thr Thr Asp Asn Gly Ile Lys Ala Tyr His Ser  
 705 710 715 720  
 Asp Gln Glu Ala Ala Gly Leu Val Arg Tyr Thr Asn Asp Arg Gly Glu  
 725 730 735

Leu Ile Phe Thr Ala Ala Asp Ile Lys Gly Tyr Ala Asn Pro Gln Val  
 740 745 750  
 Ser Gly Tyr Leu Gly Val Trp Val Pro Val Gly Ala Ala Ala Asp Gln  
 755 760 765  
 Asp Val Arg Val Ala Ala Ser Thr Ala Pro Ser Thr Asp Gly Lys Ser  
 770 775 780  
 Val His Gln Asn Ala Ala Leu Asp Ser Arg Val Met Phe Glu Gly Phe  
 785 790 795 800  
 Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Lys Lys Glu Glu Tyr Thr Asn Val  
 805 810 815  
 Val Ile Ala Lys Asn Val Asp Lys Phe Ala Glu Trp Gly Val Thr Asp  
 820 825 830  
 Phe Glu Met Ala Pro Gln Tyr Val Ser Ser Thr Asp Gly Ser Phe Leu  
 835 840 845  
 Asp Ser Val Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu  
 850 855 860  
 Gly Ile Ser Lys Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Asp Leu Val Lys  
 865 870 875 880  
 Ala Ile Lys Ala Leu His Ser Lys Gly Ile Lys Val Met Ala Asp Trp  
 885 890 895  
  
 Val Pro Asp Gln Met Tyr Ala Phe Pro Glu Lys Glu Val Val Thr Ala  
 900 905 910  
 Thr Arg Val Asp Lys Tyr Gly Thr Pro Val Ala Gly Ser Gln Ile Lys  
 915 920 925  
 Asn Thr Leu Tyr Val Val Asp Gly Lys Ser Ser Gly Lys Asp Gln Gln  
 930 935 940  
 Ala Lys Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Glu Glu Leu Gln Ala Lys Tyr Pro  
 945 950 955 960  
 Glu Leu Phe Ala Arg Lys Gln Ile Ser Thr Gly Val Pro Met Asp Pro  
 965 970 975  
 Ser Val Lys Ile Lys Gln Trp Ser Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Thr Asn  
 980 985 990  
 Ile Leu Gly Arg Gly Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gln Ala Thr Asn  
 995 1000 1005  
 Thr Tyr Phe Asn Ile Ser Asp Asn Lys  
 1010 1015  
 <;210>; 3  
 <;211>; 380  
 <;212>; PRT  
 <;213>; Streptococcus mutans  
 <;400>; 3  
 Trp Tyr Tyr Phe Asp Asn Asn Gly Tyr Met Val Thr Gly Ala Gln Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Asn Gly Val Asn Tyr Tyr Phe Leu Ser Asn Gly Leu Gln Leu Arg  
 20 25 30  
 Asp Ala Ile Leu Lys Asn Glu Asp Gly Thr Tyr Ala Tyr Tyr Gly Asn  
 35 40 45  
 Asp Gly Arg Arg Tyr Glu Asn Gly Tyr Tyr Gln Phe Met Ser Gly Val  
 50 55 60

Trp Arg His Phe Asn Asn Gly Glu Met Ser Val Gly Leu Thr Val Ile  
65 70 75 80  
Asp Gly Gln Val Gln Tyr Phe Asp Glu Met Gly Tyr Gln Ala Lys Gly  
85 90 95  
Lys Phe Val Thr Thr Ala Asp Gly Lys Ile Arg Tyr Phe Asp Lys Gln  
100 105 110  
Ser Gly Asn Met Tyr Arg Asn Arg Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gly Lys  
115 120 125  
Trp Leu Tyr Leu Gly Glu Asp Gly Ala Ala Val Thr Gly Ser Gln Thr  
130 135 140

Ile Asn Gly Gln His Leu Tyr Phe Arg Ala Asn Gly Val Gln Val Lys  
145 150 155 160  
Gly Glu Phe Val Thr Asp His His Gly Arg Ile Ser Tyr Tyr Asp Gly  
165 170 175  
Asn Ser Gly Asp Gln Ile Arg Asn Arg Phe Val Arg Asn Ala Gln Gly  
180 185 190  
Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Asn Asn Gly Tyr Ala Val Thr Gly Ala Arg  
195 200 205  
Thr Ile Asn Gly Gln His Leu Tyr Phe Arg Ala Asn Gly Val Gln Val  
210 215 220  
Lys Gly Glu Phe Val Thr Asp Arg Tyr Gly Arg Ile Ser Tyr Tyr Asp  
225 230 235 240  
Gly Asn Ser Gly Asp Gln Ile Arg Asn Arg Phe Val Arg Asn Ala Gln  
245 250 255  
Gly Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Asn Asn Gly Tyr Ala Val Thr Gly Ala  
260 265 270  
Arg Thr Ile Asn Gly Gln His Leu Tyr Phe Arg Ala Asn Gly Val Gln  
275 280 285  
Val Lys Gly Glu Phe Val Thr Asp Arg His Gly Arg Ile Ser Tyr Tyr  
290 295 300  
Asp Gly Asn Ser Gly Asp Gln Ile Arg Asn Arg Phe Val Arg Asn Ala  
305 310 315 320  
Gln Gly Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Asn Asn Gly Tyr Ala Val Thr Gly  
325 330 335  
Ala Arg Thr Ile Asn Gly Gln His Leu Tyr Phe Arg Ala Asn Gly Val  
340 345 350  
Gln Val Lys Gly Glu Phe Val Thr Asp Arg Tyr Gly Arg Ile Ser Tyr  
355 360 365  
Tyr Asp Ala Asn Ser Gly Glu Arg Val Arg Ile Asn  
370 375 380

<;210>; 4

<;211>; 486

<;212>; PRT

<;213>; Streptococcus mutans

<;400>; 4

Pro Ile Thr Ile Lys Thr Met Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Lys Asn Leu Lys Glu Leu Asn Glu Asn Ile Glu Asn Tyr Phe Ala Asp  
20 25 30

Ala Val Gly Gly Val His Leu Leu Pro Phe Phe Pro Ser Thr Gly Asp  
 35 40 45  
 Arg Gly Phe Ala Pro Ile Asp Tyr His Glu Val Asp Ser Ala Phe Gly  
 50 55 60  
 Asp Trp Asp Asp Val Lys Arg Leu Gly Glu Lys Tyr Tyr Leu Met Phe  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Met Ile Asn His Ile Ser Arg Gln Ser Lys Tyr Tyr Lys Asp  
 85 90 95  
 Tyr Gln Glu Lys His Glu Ala Ser Ala Tyr Lys Asp Leu Phe Leu Asn  
 100 105 110  
 Trp Asp Lys Phe Trp Pro Lys Asn Arg Pro Thr Gln Glu Asp Val Asp  
 115 120 125  
 Leu Ile Tyr Lys Arg Lys Asp Arg Ala Pro Lys Gln Glu Ile Gln Phe  
 130 135 140  
 Ala Asp Gly Ser Val Glu His Leu Trp Asn Thr Phe Gly Glu Glu Gln  
 145 150 155 160  
 Ile Asp Leu Asp Val Thr Lys Glu Val Thr Met Asp Phe Ile Arg Ser  
 165 170 175  
 Thr Ile Glu Asn Leu Ala Ala Asn Gly Cys Asp Leu Ile Arg Leu Asp  
 180 185 190  
 Ala Phe Ala Tyr Ala Val Lys Lys Leu Asp Thr Asn Asp Phe Phe Val  
 195 200 205  
 Glu Pro Glu Ile Trp Thr Leu Leu Asp Lys Val Arg Asp Ile Ala Ala  
 210 215 220  
 Val Ser Gly Ala Glu Ile Leu Pro Glu Ile His Glu His Tyr Thr Ile  
 225 230 235 240  
 Gln Phe Lys Ile Ala Asp His Asp Tyr Tyr Val Tyr Asp Phe Ala Leu  
 245 250 255  
 Pro Met Val Thr Leu Tyr Ser Leu Tyr Ser Gly Lys Val Asp Arg Leu  
 260 265 270  
 Ala Lys Trp Val Lys Met Ser Pro Met Lys Gln Phe Thr Thr Leu Asp  
 275 280 285  
 Thr His Asp Gly Ile Gly Val Val Asp Val Lys Asp Ile Leu Thr Asp  
 290 295 300  
 Glu Glu Ile Thr Tyr Thr Ser Asn Glu Leu Tyr Lys Val Gly Ala Asn  
 305 310 315 320  
 Val Asn Arg Lys Tyr Ser Thr Ala Glu Tyr Asn Asn Leu Asp Ile Tyr  
 325 330 335  
  
 Gln Ile Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Ala Leu Gly Asp Asp Asp Gln Lys  
 340 345 350  
 Tyr Phe Leu Ala Arg Leu Ile Gln Ala Phe Ala Pro Gly Ile Pro Gln  
 355 360 365  
 Val Tyr Tyr Val Gly Phe Leu Ala Gly Lys Asn Asp Leu Glu Leu Leu  
 370 375 380  
 Glu Ser Thr Lys Glu Gly Arg Ile Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser Ser  
 385 390 395 400  
 Glu Glu Ile Ala Lys Glu Val Lys Arg Pro Val Val Lys Ala Leu Leu  
 405 410 415

Asn Leu Phe Thr Tyr Arg Ile Gln Ser Ala Ala Phe Asp Leu Asp Gly  
                   420                  425                  430  
 Arg Ile Glu Val Glu Thr Pro Asn Glu Glu Asn Ile Val Ile Glu Arg  
                   435                  440                  445  
 Gln Asn Lys Asp Gly Ser His Ile Ala Thr Ala Glu Ile Asn Leu Gln  
                   450                  455                  460  
 Asp Met Thr Tyr Arg Val Thr Glu Asn Asp Gln Thr Ile Ser Leu Ser  
 465                  470                  475                  480  
 Met Ile Ser Cys Gln Thr  
                   485

<;210>; 5

<;211>; 1375

<;212>; PRT

<;213>; Streptococcus mutans

<;400>; 5

Met Glu Lys Lys Val Arg Phe Lys Leu Arg Lys Val Lys Lys Arg Trp  
   1                  5                  10                  15  
 Val Thr Val Ser Ile Ala Ser Ala Val Val Thr Leu Thr Ser Leu Ser  
                   20                  25                  30  
 Gly Ser Leu Val Lys Ala Asp Ser Thr Asp Asp Arg Gln Gln Ala Val  
                   35                  40                  45  
 Thr Glu Ser Gln Ala Ser Leu Val Thr Thr Ser Glu Ala Ala Lys Glu  
                   50                  55                  60  
 Thr Leu Thr Ala Thr Asp Thr Ser Thr Ala Thr Ser Ala Thr Ser Gln  
 65                  70                  75                  80  
 Pro Thr Ala Thr Val Thr Asp Asn Val Ser Thr Thr Asn Gln Ser Thr  
                   85                  90                  95  
 Asn Thr Thr Ala Asn Thr Ala Asn Phe Val Val Lys Pro Thr Thr Thr  
                   100                  105                  110

Ser Glu Gln Ala Lys Thr Asp Asn Ser Asp Lys Ile Ile Thr Thr Ser  
                   115                  120                  125  
 Lys Ala Val Asn Arg Leu Thr Ala Thr Gly Lys Phe Val Pro Ala Asn  
                   130                  135                  140  
 Asn Asn Thr Ala His Pro Lys Thr Val Thr Asp Lys Ile Val Pro Ile  
 145                  150                  155                  160  
 Lys Pro Lys Ile Gly Lys Leu Lys Gln Pro Ser Ser Leu Ser Gln Asp  
                   165                  170                  175  
 Asp Ile Ala Ala Leu Gly Asn Val Lys Asn Ile Arg Lys Val Asn Gly  
                   180                  185                  190  
 Lys Tyr Tyr Tyr Tyr Lys Glu Asp Gly Thr Leu Gln Lys Asn Tyr Ala  
                   195                  200                  205  
 Leu Asn Ile Asn Gly Lys Thr Phe Phe Phe Asp Glu Thr Gly Ala Leu  
                   210                  215                  220  
 Ser Asn Asn Thr Leu Pro Ser Lys Lys Gly Asn Ile Thr Asn Asn Asp  
 225                  230                  235                  240  
 Asn Thr Asn Ser Phe Ala Gln Tyr Asn Gln Val Tyr Ser Thr Asp Val  
                   245                  250                  255  
 Ala Asn Phe Glu His Val Asp His Tyr Leu Thr Ala Glu Ser Trp Tyr

Arg Pro Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Gly Lys Thr Trp Thr Gln Ser Thr  
 275 280 285  
 Glu Lys Asp Phe Arg Pro Leu Leu Met Thr Trp Trp Pro Asp Gln Glu  
 290 295 300  
 Thr Gln Arg Gln Tyr Val Asn Tyr Met Asn Ala Gln Leu Gly Ile His  
 305 310 315 320  
 Gln Thr Tyr Asn Thr Ala Thr Ser Pro Leu Gln Leu Asn Leu Ala Ala  
 325 330 335  
 Gln Thr Ile Gln Thr Lys Ile Glu Glu Lys Ile Thr Ala Glu Lys Asn  
 340 345 350  
 Thr Asn Trp Leu Arg Gln Thr Ile Ser Ala Phe Val Lys Thr Gln Ser  
 355 360 365  
 Ala Trp Asn Ser Asp Ser Glu Lys Pro Phe Asp Asp His Leu Gln Lys  
 370 375 380  
 Gly Ala Leu Leu Tyr Ser Asn Asn Ser Lys Leu Thr Ser Gln Ala Asn  
 385 390 395 400  
 Ser Asn Tyr Arg Ile Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly Lys  
 405 410 415  
 Lys Asp Pro Arg Tyr Thr Ala Asp Arg Thr Ile Gly Gly Tyr Glu Phe  
 420 425 430  
 Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu  
 435 440 445  
 Gln Leu Asn Trp Leu His Phe Leu Met Asn Phe Gly Asn Ile Tyr Ala  
 450 455 460  
 Asn Asp Pro Asp Ala Asn Phe Asp Ser Ile Arg Val Asp Ala Val Asp  
 465 470 475 480  
 Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Gly Asp Tyr Leu Lys Ala  
 485 490 495  
 Ala Lys Gly Ile His Lys Asn Asp Lys Ala Ala Asn Asp His Leu Ser  
 500 505 510  
 Ile Leu Glu Ala Trp Ser Tyr Asn Asp Thr Pro Tyr Leu His Asp Asp  
 515 520 525  
 Gly Asp Asn Met Ile Asn Met Asp Asn Arg Leu Arg Leu Ser Leu Leu  
 530 535 540  
 Tyr Ser Leu Ala Lys Pro Leu Asn Gln Arg Ser Gly Met Asn Pro Leu  
 545 550 555 560  
 Ile Thr Asn Ser Leu Val Asn Arg Thr Asp Asp Asn Ala Glu Thr Ala  
 565 570 575  
  
 Ala Val Pro Ser Tyr Ser Phe Ile Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln  
 580 585 590  
 Asp Leu Ile Arg Asn Ile Ile Arg Thr Glu Ile Asn Pro Asn Val Val  
 595 600 605  
 Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Glu Glu Ile Lys Lys Ala Phe Glu Ile Tyr  
 610 615 620  
 Asn Lys Asp Leu Leu Ala Thr Glu Lys Lys Tyr Thr His Tyr Asn Thr  
 625 630 635 640  
 Ala Leu Ser Tyr Ala Leu Leu Leu Thr Asn Lys Ser Ser Val Pro Arg



Val Tyr Tyr Gly Asp Met Phe Thr	Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala His
645	650 655
Lys Thr Ile Asn Tyr Glu Ala Ile Glu Thr Leu Leu Lys Ala Arg Ile	
660	665 670
Lys Tyr Val Ser Gly Gly Gln Ala Met Arg Asn Gln Gln Val Gly Asn	
675	680 685
Ser Glu Ile Ile Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Gly Ala Leu Lys Ala	
690	695 700
Thr Asp Thr Gly Asp Arg Thr Thr Arg Thr Ser Gly Val Ala Val Ile	
705	710 715 720
	725 730 735
Glu Gly Asn Asn Pro Ser Leu Arg Leu Lys Ala Ser Asp Arg Val Val	
740	745 750
Val Asn Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Pro Leu Leu	
755	760 765
Leu Thr Thr Asp Asn Gly Ile Lys Ala Tyr His Ser Asp Gln Glu Ala	
770	775 780
Ala Gly Leu Val Arg Tyr Thr Asn Asp Arg Gly Glu Leu Ile Phe Thr	
785	790 795 800
Ala Ala Asp Ile Lys Gly Tyr Ala Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu	
805	810 815
Gly Val Trp Val Pro Val Gly Ala Ala Ala Asp Gln Asp Val Arg Val	
820	825 830
Ala Ala Ser Thr Ala Pro Ser Thr Asp Gly Lys Ser Val His Gln Asn	
835	840 845
Ala Ala Leu Asp Ser Arg Val Met Phe Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln	
850	855 860
Ala Phe Ala Thr Lys Lys Glu Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Lys	
865	870 875 880
Asn Val Asp Lys Phe Ala Glu Trp Gly Val Thr Asp Phe Glu Met Ala	
885	890 895
Pro Gln Tyr Val Ser Ser Thr Asp Gly Ser Phe Leu Asp Ser Val Ile	
900	905 910
Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Ile Ser Lys	
915	920 925
Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Asp Leu Val Lys Ala Ile Lys Ala	
930	935 940
Leu His Ser Lys Gly Ile Lys Val Met Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln	
945	950 955 960
Met Tyr Ala Leu Pro Glu Lys Glu Val Val Thr Ala Thr Arg Val Asp	
965	970 975
Lys Tyr Gly Thr Pro Val Ala Gly Ser Gln Ile Lys Asn Thr Leu Tyr	
980	985 990
Val Val Asp Gly Lys Ser Ser Gly Lys Asp Gln Gln Ala Lys Tyr Gly	
995	1000 1005
Gly Ala Phe Leu Glu Glu Leu Gln Ala Lys Tyr Pro Glu Leu Phe Ala	
1010	1015 1020
Arg Lys Gln Ile Ser Thr Gly Val Pro Met Asp Pro Ser Val Lys Ile	
1025	1030 1035 1040

Lys Gln Trp Ser Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Thr Asn Ile Leu Gly Arg  
 1045 1050 1055  
 Gly Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Gln Ala Thr Asn Thr Tyr Phe Ser  
 1060 1065 1070  
 Leu Val Ser Asp Asn Thr Phe Leu Pro Lys Ser Leu Val Asn Pro Asn  
 1075 1080 1085  
 His Gly Thr Ser Ser Ser Val Thr Gly Leu Val Phe Asp Gly Lys Gly  
 1090 1095 1100  
 Tyr Val Tyr Tyr Ser Thr Ser Gly Asn Gln Ala Lys Asn Ala Phe Ile  
 1105 1110 1115 1120  
 Ser Leu Gly Asn Asn Trp Tyr Tyr Phe Asp Asn Asn Gly Tyr Met Val  
 1125 1130 1135  
 Thr Gly Ala Gln Ser Ile Asn Gly Ala Asn Tyr Tyr Phe Leu Ser Asn  
 1140 1145 1150  
 Gly Ile Gln Leu Arg Asn Ala Ile Tyr Asp Asn Gly Asn Lys Val Leu  
 1155 1160 1165  
 Ser Tyr Tyr Gly Asn Asp Gly Arg Arg Tyr Glu Asn Gly Tyr Tyr Leu  
 1170 1175 1180  
 Phe Gly Gln Gln Trp Arg Tyr Phe Gln Asn Gly Ile Met Ala Val Gly  
 1185 1190 1195 1200

Leu Thr Arg Val His Gly Ala Val Gln Tyr Phe Asp Ala Ser Gly Phe  
 1205 1210 1215  
 Gln Ala Lys Gly Gln Phe Ile Thr Thr Ala Asp Gly Lys Leu Arg Tyr  
 1220 1225 1230  
 Phe Asp Arg Asp Ser Gly Asn Gln Ile Ser Asn Arg Phe Val Arg Asn  
 1235 1240 1245  
 Ser Lys Gly Glu Trp Phe Leu Phe Asp His Asn Gly Val Ala Val Thr  
 1250 1255 1260  
 Gly Thr Val Thr Phe Asn Gly Gln Arg Leu Tyr Phe Lys Pro Asn Gly  
 1265 1270 1275 1280  
 Val Gln Ala Lys Gly Glu Phe Ile Arg Asp Ala Asn Gly Tyr Leu Arg  
 1285 1290 1295  
 Tyr Tyr Asp Pro Asn Ser Gly Asn Glu Val Arg Asn Arg Phe Val Arg  
 1300 1305 1310  
 Asn Ser Lys Gly Glu Trp Phe Leu Phe Asp His Asn Gly Ile Ala Val  
 1315 1320 1325  
 Thr Gly Ala Arg Val Val Asn Gly His Ala Ser Ile Leu Ser Leu Met  
 1330 1335 1340  
 Val Phe Arg Leu Arg Glu Ser Ser Leu Gln Ser Val Lys Val Val Ser  
 1345 1350 1355 1360  
 Asn Thr Met Ile Leu Ile Pro Glu Met Lys Phe Val Ile Val Met  
 1365 1370 1375

<;210>; 6

<;211>; 5684

<;212>; DNA

<;213>; Streptococcus mutans

<;400>; 6

gcattgcctat tgaggttatg gccaaagcggg gcattaaaac attgctttat gggcccatga 60

aaccagttgg tctggaatac ccacaagact acaaggggcc gcgagatggt gattataagg 120  
ctccctatgc tgttgtgcag cttcgacaag ataatgcagc tggcagcctt tacaatattg 180  
ttggttttca gacctatctt aagtgagtg acaaaaaacg tgtcttttcc atgattccag 240  
gtctggagca agcacatttc gttcgttatg gcgtcatgca tcgcaactct tacattgact 300  
cccctaactc tcttgtcctt acctttgcaa cgtgtaaaaa tccaaatcta ttttttctg 360  
gacaaatgac aggtgtagag ggttatgttg aatctgcagc ttctgggctt gttgctggaa 420  
tcaatgctgt tcgtcgttcc aaagatgaag aagcagtaat ctttccgcaa acaacagcta 480  
ttggtgcttt accgtattat attacacata caaaaagtaa gcattttcaa ccaatgaata 540  
ttaattttgg tatcatcaaa gatttgggtg gaccacgtat tcgtgataag aagaacgtt 600  
atgagaagat tgctgagcga tcaactaaag atctacagca atttttaact gtttaaataa 660  
gatttttaaa aatattggtt ttattaaata ttgagataga aaataactat attagatttg 720  
tttggagccc tatttcatct attgattggc ttttttgcata atcagtttta agaggacggc 780  
acgcaagtaa ctaactctgt cgtttcattg ctaaagttgg agtttgaat ctccaacttt 840  
gccagatgct gtaagcagcg acaattgttg tgggtactcc ctgtagataa tgtaaaaaac 900  
gacagcaatt agactgttgt tttttgttg gatagtttg tttttatcat gttgtcataa 960  
taataaaaaa aaaaaatttg aatattcttt tttattttta aagaaaaaag aatttttgtt 1020  
gcaaaaagat tgttttatta ttgaaaaggt gttacaatta taacgttttg aataaaacag 1080  
tttaaaattt ggaggttccct aatggacaag aaagtgcgtt ataaactgcg caaagttaaa 1140  
aaaagatggg tgacagtatc tgttgcatct gctgtgatga ctttaactac actttcgggt 1200  
ggcttggtta aagcagattc taatgaatcg aaatcccaaa tttctaataa ttctaatacc 1260  
agtgttgta ctgctaata agaactctaat gtaacaaccg aagcgacatc taagcaagaa 1320  
gctgctagta gtcaactaa tcatacagta acgacaagca gtagctctac ttcggtagtt 1380  
aatcccaag aggttgtaag taatccttat actgttgggg aaacagcttc taatggtgaa 1440  
aagcttcaaa atcaacaac tacagttgac aaaacttctg aagctgctgc taataatatt 1500  
agtaacaaa caaccgaagc tgatacagat gttattgatg atagcaatgc agccaatcta 1560  
caaataattg aaaaacttcc caatgtaaaa gaaattgatg gtaagtatta ttattatgac 1620  
aataacggca aagttcgtac taattttaca ttaattgctg atggcaaaat ttacatttt 1680  
gatgaaactg gcgcttatac tgatacatca attgacactg taaataaaga tatcgtcaca 1740  
acaagaagta atctatacaa aaaatataat caagtttatg atcgtctgc acagagcttt 1800  
gagcatgttg atcattattt gacagctgag agttggtatc gtcctaagta catcttgaa 1860  
gatggcaaaa catggacaca gtcaacagaa aaagatttcc gtcccttatt gatgacatgg 1920  
tggcctgacc aagaaacgca gcgtcaatat gtttaactaca tgaatgcaca gcttggcatt 1980  
aacaagactt atgatgatac aagtaatcaa ttgcaattaa atattgcagc tgcaactatt 2040  
caagcaaaaa ttgaggccaa aattacaact ttaaagaata ctgattggct gcgtcagact 2100  
atttccgcat ttgttaagac acagtcagct tggaaacagt acagcgaaaa accgtttgat 2160  
gatcatttac aaaatggagc agtgctttac gataatgaag gaaaaatta gccttatgct 2220  
aattccaact accgtatctt aaatcgacc ccgaccaatc aaaccgaaa gaaagatcca 2280  
aggatacag ctgataacac tatcgcggt tatgaattcc ttttgccaa cgatgtggat 2340  
aattctaact ctgtcgtgca ggccgaacaa ttgaactggc tacattttct catgaacttt 2400  
ggtaacattt atgccaatga tccggatgct aactttgatt ccattcgtgt tgatgcggt 2460  
gataatgttg atgctgactt gctccaaatt gctggggatt acctcaaagc tgctaagggg 2520  
atccataaaa atgataaagc tgctaagat catttgcata ttttagaggc atggagtac 2580  
aacgacactc cttaccttca tgatgatggc gacaatatga ttaatatgga taataagctg 2640  
cgtttgtctc tattattttc attagctaaa ccttaaatc aacgttcagg catgaacct 2700  
ctcatcacta acagtttggg gaatcgaaat gatgataatg ctgaaactgc cgcagtcct 2760  
tcttattcct tcatccgtgc ccatgacagt gaagtgcagg atttgattcg tgatatcatc 2820  
aaggcagaaa tcaatcctaa tgttgcggg tattcattca ctatggagga aatcaagaag 2880  
gctttcgaga tttaacaa agacttatta gctacagaga agaaatacac acactataat 2940  
acggcacttt cttatgccct gcttttaacc aacaaatcca gtgtgcgcg tgtctattat 3000  
ggggatatgt ttacagatga cgggcaatac atggctcata agacgatcaa ttacgaagcc 3060

atcgaaaccc tgcttaaagc tcgtattaag tatgtttcag gcggtcaagc catgcgcaat 3120  
 caacaggttg gcaattctga aatcattacg tctgtccgct atggtaaagg tgctttgaaa 3180  
 gcaacgggata caggggaccg caccacacgg acttcaggag tggccgtgat tgaaggcaat 3240  
 aacccttttt tacgtttgaa ggctttgat cgcgtggttg tcaatatggg agcagcccat 3300  
 aagaaccaag cttaccgacc tttactcttg accacagata acggtatcaa ggcttatcat 3360  
 tccgatcaag aagcggctgg tttggtgcgc tacaccaatg acagagggga attgatcttc 3420  
 acagcggctg atattaaagg ctatgccaac cctcaagttt ctggctatit aggtgtcttg 3480  
 gttccagtag gcgtgccgc tgatcaagat gttcgcgttg cggctagcac ggccccatca 3540  
 acagatggca agtctgtgca tcaaatgcg gcccttgatt cagcgtcat gtttgaaggt 3600  
 ttctctaatt tccaagcttt cgccactaaa aaagaggaat ataccaatgt tgtgattgct 3660  
 aagaatgtgg ataagtttg ggaatggggg gtcacagact ttgaaatggc accgcagtat 3720  
 gtgtcttcaa cggatggttc tttcttggat tctgtgatcc aaaacggcta tgcttttacg 3780  
 gaccgttatg atttgggaat ttccaaacct aataaatagc ggacagccga tgatttgggtg 3840  
 aaagccatca aagcgttaca cagcaagggc attaaagtaa tggctgactg ggtgcctgat 3900  
 caaatgtatg cttccctga aaaagaagt gtaactgcaa cccgtgtga taagtatggg 3960  
 actcctgttg caggaagtca gatcaaaaac accctttatg tagttgatgg taagagttct 4020  
 ggtaaagatc aacaagccaa gtatggggga gctttcttag aggagctgca agcgaagtat 4080  
 ccggagcttt ttgcgagaaa acaaatttcc acaggggttc cgatggatcc ttctgttaag 4140  
 attaaagcaat ggtctgcaa gtactttaat gggacaaata ttttagggcg cggagcaggc 4200  
 tatgtcttaa aagatcaggc aactaatact tactttaata ttcagataa taaagaaata 4260  
 aacttccttc ctaaaacatt gttaaacca gatagtcaag ttggtttctc ttatgacggt 4320  
 aaaggttatg tttattatc aacgagtgtg taccaagcca aaaatacttt catcagcgaa 4380  
 ggtgataaat ggtattatit tgataataac ggttatatgg tcaactgtgc tcaatcaatt 4440  
 aacggtgtta attattatit cttatcaaat ggcctacagc tcagagatgc tattcttaag 4500  
 aatgaagatg gaacttacgc ttattatgga aatgacggtc gccgttatga aatggttat 4560  
 tatcaattca tgagtgtgt atggcgtcac ttcaataatg gtgaaatgag tgttgatta 4620  
 actgtaattg atggtcaggt tcaatacttt gatgaaatgg gctatcaagc caaaggaaaa 4680  
 tttgtaacaa ctgccgatg taaaataaga tttttgata agcaatctgg gaacatgtac 4740  
 cgtaatcggt ttattgaaa cgaagaaggt aaatggctgt atctcgggtga agatggtgca 4800  
 gcagtgcag gatctcaaac cattaacggt caacacctgt acttagagc aaacggtgtt 4860  
 caggatcaagg gtgaatttgt cactgaccac cagggccgta tcagctatta cgacggcaat 4920  
 tcaggggatc aaatccgcaa ccgctttgtc cgcaatgctc agggatcaatg gttctacttt 4980  
 gataacaatg gctatgccgt aaccggtgcc agaaccatta acggtcaaca cctatacttt 5040  
 agagcaaacg gtgttcaggt caagggtgaa tttgtcactg accgtacgg ccgtatcagc 5100  
 tattacgagc gcaattcagg ggatcaaatc cgcaaccgct ttgtccgcaa tgctcagggt 5160  
 caatggttct actttgataa caatggctat gccgtaaccg gtgccagaac cattaacggt 5220  
 caacacctat acttagagc aaacggtgtt caggatcaagg gtgaatttgt cactgaccgc 5280  
 cagggccgta tcagctatta cgacggcaat tcaggggatc aaatccgcaa ccgctttgtc 5340  
 cgcaatgctc agggatcaatg gttctacttt gataacaatg gctatgccgt aaccggtgcc 5400  
 agaaccatta acggtcaaca cctatacttt agagcaaacg gtgttcaggt caagggtgaa 5460  
 tttgtcactg accgccagc ccgtatcagt tattacgatg ctaactctgg agaacgagtt 5520  
 cggattaact aattgaaaa acgctctctt aagttaatta agagggcgtt tctagggtta 5580  
 ggagttttta atattattta ttatttttct aaaaaatgaa gaatttcatt ataaattaat 5640  
 tacgatacat tgtgcttttg ttatagaagt gttacaatac tagt 5684

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

テーマコード(参考)